

**Untersuchungen zur photometrischen Bestimmung
der Cholinesterase - Restaktivität menschlicher
Seren bei Vergiftung mit E 600**

von

Magdalena Petényi geb. Kötél

aus

Budapest / Ungarn





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. G. Koch
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 11.7.1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	6
II. PROBLEMSTELLUNG	16
III. EIGENE VERSUCHE	17
A) <u>Verfahren I:</u>	17
Photometrische Bestimmung von Cholinesterase- Restaktivitäten menschlicher Seren durch enzy- matische Hydrolyse von S-Butyryl-Thiocholin- Jodid	
1. Reagenzien	17
2. Versuchsanordnung	18
3. Variable Faktoren zur Prüfung des Verfah- rens und zur Bestimmung der optimalen Bedingungen	20
4. Auswertung der Ergebnisse	21
a) Versuchsbedingungen je Versuchseinheit	21
b) Meßwerte von Cholinesterase-Restaktivi- tät je Versuchseinheit	22
- Zusammenhang zwischen Cholinester- aserestaktivität und Alter der Seren	24
- Auswirkung der Konzentrations- änderung von E 600 auf die Cholin- esterase-Restaktivität	29

- Änderung der Cholinesterase-Restaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	33
- Zusammenhang zwischen S-Butyryl-Thiocholinjodid-Menge und Cholinesterase-Restaktivität-Werten	34
Optimale Verdünnungsflüssigkeit	
B) <u>Verfahren II:</u>	42
Photometrische Bestimmung von Cholinesterase-Restaktivität menschlicher Seren durch enzymatische Hydrolyse des Acetylcholinjodids	
1. Reagenzien	42
2. Versuchsanordnung	43
3. Auswertung der Ergebnisse	44
- Variable Faktoren und deren Optimum	45
- Auswirkung der Konzentrationsänderung von E 600 auf die Cholinesterase-Restaktivität	46
- Mängel des Verfahrens und Begründung dessen	47
C) <u>Verfahren III:</u>	51
Photometrische Bestimmung von Cholinesterase-Restaktivität menschlicher Seren bei enzymatischer Hydrolyse des S-Butyryl-Thiocholinjodids (kinetischer Test)	

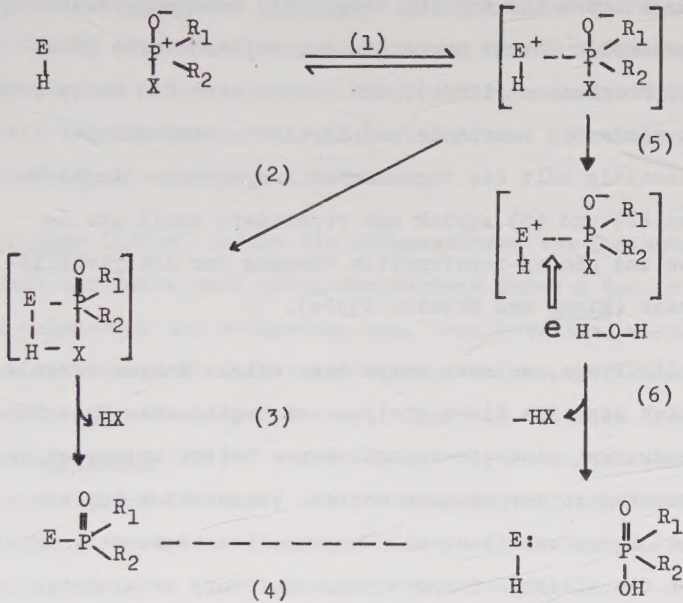
1. Reagenzien	51
2. Versuchsanordnung	52
3. Auswertung der Ergebnisse	53
- Überprüfung der optimalen Konzentration von E 600	53
- Zusammenhang zwischen Cholinesterase-Restaktivität und Alter der Seren	57
- Abhängigkeit der Cholinesterase-Restaktivität von der Charge des Testmaterials	59
IV. DISKUSSION	61
1. Vergleichende Analyse der drei Verfahren	61
a) Allgemeine Schlußfolgerungen	61
b) Unterschiedliche Ergebnisse bei den drei Verfahren	61
- Abhängigkeit vom Alter der Seren	61
- Änderung von Inkubationszeit und Substratmenge und deren Auswirkung auf die Cholinesterase-Restaktivität	62
- Auswirkung der Änderung von E 600-Konzentration	63
- Die Rolle des Substrats bei den Verfahren I - III	64
V. ZUSAMMENFASSUNG	65
VI. LITERATURVERZEICHNIS	67

I. EINLEITUNG

Schon seit vielen Jahren hat E 605 (= Parathion = Diäthyl-O-p-nitrophenylthiophosphat einen festen Platz unter den Insekticiden.

Innerhalb des menschlichen Körpers wird es zu den P=O Analogen (Paraoxon = E 600) oxydiert, was gleichzeitig einer Aktivierung seiner Hemmwirkung gegen Cholinesterase (zum größten Teil gegen Acetylcholinesterase) gleichkommt. Im Stoffwechselvorgang folgt hierauf eine enzymatische Hydrolyse jener P=O Verbindungen an der Säure-Anhydrid-Bindung. (Koelle 1963; Mazur 1946b; Neal 1967).

Augustinsson (1955a) nahm unter Verwendung der Forschungsergebnisse von Jansen, Aldridge (1955a), Wilson, Wagner-Jauregg (1954), Meyers u.a. (restliche Literatur siehe bei Augustinsson 1955a) folgenden Reaktionsmechanismus zur Inaktivierung der organischen P=O Verbindungen an:



- e = "Phosphorylphosphatase
 E = Cholinesterase
 X = F; CN; Aryl-Rest; Pyrophosphat
 R₁ = R₂ = Alkylgruppe (CH₃-O; C₂H₅-O-)

Die Reaktionen (2) und (3) stellen die eigentlichen Hemmungsreaktionen der organischen Phosphorverbindungen dar. Die Reaktionen (5) und (6) zeigen die Dephosphorylierung des gehemmten Enzyms durch die Augustinsson'sche Phosphorylphosphatase (1954a), bzw. durch eine bis heute noch nicht eindeutig bestimmte und isolierte Enzymgruppe. Gleichzeitig hält die angenommene Enzymgruppe die Reaktionen (2) und (3) zurück und verhindert damit die im großen und ganzen irreversible Hemmung der Acetylcholinesterase (Mazur und Mitarb. 1946a).

Über die Frage, welches Enzym bzw. welche Enzyme verantwortlich sind für die Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen, sind von verschiedenen Seiten umfangreiche Untersuchungen vorgenommen worden. Vornehmlich wurden hierbei Serumfraktionen als Enzymquellen verwendet. Da jedoch die gleichen Serumenzyme u.U. fähig sind, Ester zu spalten, die keinen Phosphor enthalten, ließ sich weniger über ihre Spezifität und Eigenschaften sagen als etwa bei den Gewebeenzymen (Koelle 1963).

Mazur und Bodanski fanden 1946, daß sich im Plasma und in den Geweben vom Kaninchen und Menschen ein DFP-hydrolysierendes Enzym befindet, welches sich nicht mit einer bekannten Cholinesterase oder Phosphatase identisch zeigte. Bei ihren Untersuchungen wurde DFP nur zu einem

extrem niedrigen Anteil an der Alkyl-Ester-Bindung, jedoch im entscheidenden Maße an der Phosphor-Fluor-Bindung gespalten. Mazur und Bodanski (1946b) konnten das verantwortliche Enzym 30-fach konzentrieren (unter Verlust der Phosphatase-, Esterase- und Cholinesterase-Aktivität) und gaben ihm den Namen "Phosphofluorase" bzw. "Fluorophosphatase" (Grob und Mitarb. 1947).

Aldridge (1953a) teilte die Serumesterase vom Kaninchen, Pferd und Ratte nach ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in eine A-Esterase und B-Esterase ein. Jene Esterase, welche durch E 600 nicht inaktiviert wurde, nannte er A-Esterase. (Aryl- oder Aromatic-Esterase). In einer weiteren Arbeit fand Aldridge (1953b) ein E 600 hydrolysierendes Enzym, genannt E 600-Esterase, wobei er durch vergleichende Experimente bezüglich der Eigenschaften dieses Enzyms feststellte, daß es identisch mit der schon bekannten A-Esterase, aber nicht mit der sauren und alkalischen Serumphosphatase. Innerhalb der einzelnen Tiergattungen schwankten die jeweiligen Enzymaktivitäten, was seiner Meinung nach auf die Proteinunterschiede zurückzuführen ist.

Unter den fünf bestehenden Phenol-Ester-hydrolysierenden Esterasen des menschlichen Blutes scheinen nach Mounter und Whittaker (1953) die "erythrocyt aromatic esterase"

und die "plasma aromatic esterase", wenn nicht identisch, so doch extrem ähnlich zu sein. Nach jenen Autoren sind zudem beide wahrscheinlich identisch mit der von Aldridge (1953a; 1953b) gefundenen A-Esterase.

Die ausgedehnten Untersuchungen über die enzymatische Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen von Augustinson und Heimbürger (1954a; 1954b; 1954c; 1954d; 1954e; 1955a; 1955b; 1957) beschäftigten sich an erster Stelle mit Tabun, welches durch ein Enzym hydrolysiert wird, einstweilen als "Tabunase" bezeichnet. Es ist jedoch nicht spezifisch für Tabun, und so führten die Autoren eine allgemeine Bezeichnung für organische Phosphorverbindungen hydrolysierende Enzyme ein, nämlich "Phosphorylphosphatase". Letztere und die Cholinesterase konnten sie in Cohn'schen Fraktionen aus dem menschlichen Serum von anderen Esterasen trennen (Fraktion IV-1; Tabunase; Fraktion IV-6: Cholinesterase) (1954b). Es wurde ferner vermutet, daß Tabun und DFP (Diisopropylfluorophosphat) vom selben Enzym hydrolysiert werden.

Tabun wird bei der hydrolytischen Spaltung an der P-CN Bindung getrennt. Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte üben einen schwach-hemmenden Einfluß auf die Tabunaseaktivität aus (etwa 15 % des ursprünglichen Tabun wird in der enzymatischen Hydrolyse nicht angegriffen) (1954c).

In einer weiteren Arbeit untersuchten Augustinsson und Heimbürger (1954a) die Spezifität jener Phosphorylphosphatase (= Tabunase). Ihre Ergebnisse zeigten, daß von ihr (isoliert innerhalb der Fraktion IV-1 sowohl Tabun, DFP wie Mintacol = E 600 hydrolysiert wird, E 600 jedoch nur durch "andere" Enzyme gespalten werden kann. Unter anderem stellten sie hierbei fest, daß Chlorthion nicht angegriffen wird. In vergleichenden Experimenten zwischen Tabun und Mintacol zeigten Augustinsson und Mitarb. (1954e), daß (speziell im Kaninchenblut) zwei Enzyme vorhanden sind, wobei jedes Enzym beide Substrate spaltet, und daß das Enzym, welches Mintacol spaltet, von Aldridge A-Esterase genannt, nicht identisch ist mit der Tabunase. Augustinsson vermutet deshalb, daß E 600 sowohl durch jene Aldridge'sche A-Esterase als auch durch eine Phosphorylphosphatase hydrolysiert wird, beide wahrscheinlich anwesend in der Cohn'schen Fraktion IV-1.

1960 versuchte dann Main das Paraoxon-hydrolysierende Enzym aus Schafs-Serum möglichst rein darzustellen. Durch eine 330-385 fache Reinigung resultierte ein elektrophoretisch ermitteltes 80-95 %ig reines Enzympräparat.

Main stellte bei der gereinigten Fraktion eine Zunahme

(0,29 mM auf 4,2 mM) der Michaelis-Konstante fest, was er auf "Paraoxonase"-Aktivatoren im Nativserum zurückführte, welche durch den Reinigungsvorgang entfernt worden zu sein scheinen. Außerdem fand er, daß das Molekulargewicht der Paraoxonase im Bereich von 35 000 bis 50 000 liegt.

Bei in vitro Versuchen mit den Seren weißer Mäuse untersuchten Schaumann und Schiller (1960) die Inaktivierung von Cholinesterase-Hemmern. Hierbei gingen sie davon aus, daß an der Inaktivierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge beteiligt sind: Eine Adsorption an das Serum und eine fermentative Zerstörung. Paraoxon wird durch das Serum schnell abgebaut und außerdem stark adsorbiert. DFP jedoch wird weder abgebaut noch adsorbiert.

1961 gelang es dann Erdös und Boggs, die Vermutung früherer Arbeiten zu bekräftigen, daß mehrere Faktoren für die Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum verantwortlich sind. Sie zeigten, daß die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität in der Fraktion IV-1 zwar durch Äthylen-diamintetraacetat vollständig gehemmt werden kann, daß aber hierbei nicht die Gesamtaktivität des Nativserum erfaßt war. Auf der Suche nach einer Äthylendiamintetraacetat-resistenten Aktivität fanden sie eine E 600-spezifische Enzymaktivität im Humanalbumin (Fraktion V), welche durch Aluminon völlig auszuschalten war. Bei

Mischung der Fraktion IV-1 und V waren die Ergebnisse mit den selektiven Inhibitoren ähnlich dem normalen Serum.

In der gleichen Richtung liefen die Untersuchungen von Skrinjaric-Spoljar und Mitarb. (1968). Als Substrat verwendeten sie Paraoxon und Armin, und es zeigte sich, daß für beide Substrate sowohl in der Fraktion IV-1 als auch in der Fraktion V eine Aktivität bestand. In der erstgenannten war die Aktivität für beide Substanzen höher als in der zweiten. In der Fraktion IV-1 erwies sich die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität größer als die Armin-hydrolysierende. In der Fraktion V war genau das Gegenteil zu beobachten.

Ihre Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, daß mehr als ein Enzym für die Hydrolyse von Paraoxon (und für Armin) im menschlichen Serum existiert. Nativseren aber enthalten nach Meinung von Skrinjaric-Spoljar und Mitarb. wahrscheinlich noch ein Enzym mit ausgesprochener "Paraoxonase"-Aktivität, da in der Mehrzahl der Seren Paraoxon schneller hydrolysiert wurde als Armin, wohingegen eine Mischung von Fraktion IV-1 und Fraktion V eine grössere "Arminase"- als "Paraoxonase"-Aktivität hervorbrachte.

Krisch (1968) unterscheidet hinsichtlich der E 600-spaltenden Aktivität des Serums beim Menschen zwei sich über-

lagernde Gruppen von Normalpersonen. Es ergibt sich daraus die Frage, ob diese Aktivitätsunterschiede auf quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder auf zwei qualitativ verschiedene Enzymproteine zurückzuführen sind. Krisch findet bei den Versuchspersonen mit hohen und niedrigen Aktivitäten gleiche Michaelis-Konstanten, wobei es im Einzelfall nicht möglich war, einzelne Personen wegen des großen Überlagerungsbereiches bestimmten Aktivitätsgruppen zuzuordnen. Er hält es für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Gruppen genetisch bedingt sind.

Jener genetische Aspekt, wie er von Krisch (1968) geäußert wurde, fand in den Ergebnissen von Geldmacher-v. Mallinckrodt und Lindorf (1969) seine Bestätigung. Bei ihnen zeigte sich in Versuchen, die den Vergiftungsgrad der Serumcholinesterase durch E 600 untersuchten, daß sich bei den Probanden eine Gruppierung in niedere, mittlere und hohe Restaktivität nach der Vergiftung durch E 600 durchführen ließ.

Baumgartner (1970) versuchte fortführend diese Erscheinung so zu deuten, daß entweder ein Polymorphismus der Serumcholinesterasen oder ein Polymorphismus des E 600-spaltenden Fermentes besteht, wobei letzteres der Literatur nach am wahrscheinlichsten erscheint. Es ist Baum-

gartner gelungen, eine eindeutige Korrelation zwischen der Cholinesterase-Restaktivität und der fermentativen Spaltung von Paraoxon nachzuweisen; derart, daß Personen mit hoher Paraoxonaseaktivität auch eine hohe Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 in geeigneter Konzentration aufwiesen.

II. PROBLEMSTELLUNG

Da die Gruppeneinteilung und die Prüfung auf eine genetische Ursache derselben offenbar sicherer über die Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 erfolgen kann als nach Krische, sollte in der vorliegenden Arbeit nach Verfahren gesucht werden, die unter Verzicht auf die aufwendige Warburg-Apparatur einfach durchführbar waren.

Die Klärung der Fragestellung hinsichtlich Cholinesterase-Restaktivität erfordert eine große statistische Aufnahme, die die Gesamtbevölkerung repräsentiert. Zu dieser Arbeit ist ein Meßverfahren nötig, das eine schnelle Durchführung der Untersuchungen ermöglicht, dessen Serumbedarf klein ist, dessen Ergebnisse gut reproduzierbar sind und die drei Typen von Seren gut differenzierbar sind.

In der vorliegenden Arbeit sind mehrere Methoden zur Cholinesterase-Restaktivitätsbestimmung beschrieben, die von uns entwickelt worden sind mit dem Ziel zu prüfen, ob für die Praxis ein geeignetes Verfahren im Sinne der obengenannten Kriterien zu finden ist.

III. EIGENE VERSUCHE

A) Verfahren I

Photometrische Bestimmung von Cholinesterase-Restaktivitäten menschlicher Seren nach Vergiftung mit E 600 aufgrund der Farbänderung des Indikators bei enzymatischer Hydrolyse des S-Butyryl-Thiocholinjodids.

1. Reagenzien:

Merckotest^R Cholinesterase enthält:

1. Chromogenlösung: 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,7
0,25 mM 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
2. Substratlösung: 0,12 M S-Butyrylthiocholinjodid

Prinzip: Die Cholinesterase katalysiert die Hydrolyse von Cholinestern. Als Substrat wird bei der vorliegenden Methode S-Butyryl-thiocholinjodid verwendet, das von der Cholinesterase des Plasmas sehr leicht gespalten wird. Die schon bei geringer Hämolyse freiwerdende Acetylcholinesterase der Erythrozyten verursacht hierbei keine Störung.

Als Indikator dient 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat, das durch freigesetztes Thiocholin zum gelb gefärbten

5-Mercapto-2-nitrobenzoat reduziert wird. (Knedel und Böttger (1967), Szasz (1968), Garry und Roth (1955).

Außerdem verwendeten wir:

Phosphatpuffer

0,9 %ige Natriumchloridlösung

alkoholische Lösung von DFP (Diisopropylfluorophosphat) in 10^{-3} m Konz.,

E 600 in verschiedenen Konzentrationen, verdünnt mit dem oben genannten Phosphatpuffer und NaCl-Lösung.

2. Versuchsanordnung

Frisch entnommene Blutproben von Personen mit bekannten Cholinesterase-Restaktivitäten (nach Geldmacher-v. Mallinckrodt, Lindorf und Rabast, 1969) wurden zentrifugiert und das Serum wurde sofort abgetrennt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Untersuchungen erfolgten am Tag der Entnahme sowie an weiteren vier Tagen.

Inkubation mit E 600:

Je 0,05 ml Serum wurde in zwei Reagenzgläser pipettiert, in das erste Reagenzglas wurde 0,45 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung, in das zweite 0,45 ml E 600-Lösung zugefügt. Die Ansätze wurden 60 (bzw. 30 und 90) min lang bei 28° C im Wasserbad inkubiert.

Messung der Cholinesterase-Restaktivität:

30 (bzw. 60 und 90) min nach dem Einstellen der Ansätze ins Wasserbad wurden in drei Reagenzgläser je 0,1 ml Substratlösung und je 2,0 ml Chromogenlösung, sowie 0,03 (bzw. 0,04 und 0,02) ml von den Inkubationsansätzen pipettiert. (Das dritte Reagenzglas enthielt die Lösung für den Leerwert.) Es erfolgte weitere 20 min Inkubation bei 28° C. Nach Ablauf der Zeit haben wir mit drei Tropfen DFP-Lösung die Reaktion gestoppt.

Die Messung der Serumcholinesterase-Restaktivitäten erfolgte - aufgrund der Farbänderung des Indikators - spektrophotometrisch mit dem Spektralphotometer DK 2 der Firma Beckman. Wellenlänge 405 nm, Messung gegen Wasser als Leerwert.

Zur Beurteilung der E 600 Wirkung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen wurde die Restaktivität in % der Normalaktivität ausgedrückt.

3. Variable Faktoren zur Prüfung des Verfahrens und zur Bestimmung der optimalen Bedingungen:

Wir haben verschiedene Faktoren schrittweise geändert, um optimale Differenzierung der drei Typen und statistisch gesicherte Reproduzierbarkeit der Meßwerte zu erzielen.

Variable Faktoren waren:

- Alter des Serums: 0, 1, 2, > 2 Tage alt

- E 600 in folgenden Konzentrationen:

1,75 x 10⁻¹⁰ molar

1,79 x 10⁻¹⁰ molar

1,84 x 10⁻¹⁰ molar

2,05 x 10⁻¹⁰ molar

2,07 x 10⁻¹⁰ molar

- dem Substrat und Indikator haben wir verschiedene Mengen von mit E 600 inkubiertem Serum zugefügt: es waren 0,02, 0,03 bzw. 0,04 ml der Inkubationsansätze.

- Inkubationszeit: 30, 60 und 90 min

- Charge des Testmaterials (Merckotest^R Cholinesterase)

- für die Verdünnung von E 600 verwendeten wir 0,9 %ige NaCl-Lösung, und Phosphatpuffer von pH 7,7.

4. Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Analyse erfolgt je Versuchseinheiten, wo-
runter wir verstehen, daß die gleichen Bedingungen für die
Messungen in Bezug auf Giftkonzentration, Inkubationsan-
satz, Inkubationszeit, Charge und Verdünnungsflüssigkeit
gelten.

a) Versuchsbedingungen je Versuchseinheit:

Tabelle 1 zeigt die Versuchseinheiten mit den entsprechen-
den Versuchsbedingungen.

Tabelle 1: Versuchsbedingungen je Versuchseinheit

Versuchs- einheit	Merckotest Charge	mol. E 600 Konzentr.	Verdünn.- flüss.	Inkub. ansatz ml	Inkub. zeit min
1	1	$2,05 \times 10^{-10}$	NaCl	0,04	60
2	2	1,84 "	NaCl	0,03	60
3	5	1,84 "	Ph.p.	0,02	60/90*
4	1	2,05 "	NaCl	0,03	60
5	5	1,84 "	Ph.p.	0,02	30
6	4	1,79 "	NaCl	0,02	60
7	2	1,79 "	NaCl	0,03	60
8	4	1,75 "	NaCl	0,02	60
9	3	1,84 "	NaCl	0,02	60
10	3	1,84 "	NaCl	0,03	60
11	4	1,84 "	NaCl	0,02	60
12	4	1,79 "	NaCl	0,02	60
13	5	1,84 "	Ph.p.	0,02	60

*) Die Erklärung siehe Seite 33

b) Meßwerte von Cholinesterase-Restaktivitäten je Versuchseinheit:

Tabelle 2 zeigt unsere gesamten Meßergebnisse bei Verfahren I. Die Cholinesterase-Restaktivitätswerte sind nach Versuchseinheiten und Cholinesterase-Restaktivitäts-Typen gruppiert, sowie nach Alter der Seren.

Tabelle 2: Cholinesterase-Restaktivitäten in % der Normalaktivitäten bei Verfahren I

Versuchseinheit	Cholinesterase-Restaktivitäten in % der Normalaktivität					
	Seren 0, 1, 2 Tage alt			Seren älter als 2 Tage		
	Cholinesterase-Restaktivitätstypen			Cholinesterase-Restaktivitätstypen		
	niedrig	mittel	hoch	niedrig	mittel	hoch
1	18	-	48	12	18	20
	11	33	45	-	-	-
2	4	30	-	20	-	46
	7	29	73	17	42	-
	8	28	66	6	9	19
	10	34	52	31	57	64
	27	54	71	-	-	-
	-	36	63	-	-	-
3	15	-	60	20	-	53
	21	-	76	26	-	54
	22	-	68	11	-	71
	11	-	77	-	-	-
	25	-	69	-	-	-

Versuchs- einheit	Cholinesterase-Restaktivitäten in % der Normalaktivität					
	Serien 0, 1, 2 Tage alt			Serien älter als 2 Tage		
	Cholinesterase- Restaktivitätstypen			Cholinesterase- Restaktivitätstypen		
	niedrig	mittel	hoch	niedrig	mittel	hoch
4	-	15	27			
5	16	-	95	15	-	40
	19	-	-	16	-	47
6	25	38	50	-	-	-
7	22	29	47	-	-	-
8	-	-	-	37	42	59
9	17	30	54	-	-	-
	18	41	52	-	-	-
10	28	48	71	-	-	-
	20	43	59	-	-	-
11	22	42	38	-	-	-
	11	20	33	-	-	-
	16	-	50	-	-	-
12	-	-	-	23	47	60
	-	-	-	30	47	45
13	-	-	53	-	-	-
	-	-	42	-	-	-

Aus der Tabelle 2 erkennt man, daß die Änderung der Versuchsbedingungen auf die verschiedenen Typen unterschiedliche Auswirkung hat. Im weiteren wollen wir einzeln prüfen, wie die Cholinesterase-Restaktivitäten sich bei Variation von Faktoren verhalten.

Zusammenhang zwischen Cholinesterase-Restaktivität und Alter der Seren:

In den Tabellen 3 und 4 sind die Ergebnisse der Versuchseinheit 2 dargestellt, in den Tabellen 5 und 6 die dazu gehörigen Parameter: Mittelwerte und Standardabweichungen.

Tabelle 3: Cholinesterase-Restaktivität bei Versuchseinheit 2, mit frischen Seren gearbeitet

Cholinesterase-Restaktivität in % der Normalaktivität
Seren 0, 1 und 2 Tage alt

ChERA Messung	Typ:	niedrig	mittel	hoch
1		4	30	-
2		7	29	73
3		8	28	66
4		10	34	52
5		-	36	63
6*		27*	54*	71*

*) Bei der Messung 6 ist nachweisbar, daß die Werte durch Fehler der Versuchsanordnung abweichen. Die Auswertung erfolgte ohne diese Werte.

Tabelle 4: Cholinesterase-Restaktivität bei Versuchseinheit 2, mit alten Seren gearbeitet

Cholinesterase-Restaktivitäten
in % der Normalaktivität
Seren älter als 2 Tage

Messung	ChERA	niedrig	mittel	hoch
	Typ			
1		20	-	46
2		17	42	-
3		6	9	19
4		31	57	64

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen von Cholinesterase-Restaktivitäten - Versuchseinheit 2, mit frischen Seren gearbeitet

ChERA Typen	Parameter	Mittelwert $\bar{x}$	Standard- abweichung σ in % von $\bar{x}$	
niedrig		7,20	2,5	29,0
mittel		31,00	3,5	11,2
hoch		65,00	8,3	12,7

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen von Cholinesterase-Restaktivitäten - Versuchseinheit 2, mit alten Seren gearbeitet

ChERA Typen	Parameter: Mittelwert $\bar{x}$	Standard- abweichung σ in % von $\bar{x}$
niedrig	18,5	10,3 55,6
mittel	36,0	24,6 68,3
hoch	43,0	22,6 52,5

Aus den Tabelle 3 bis 6 ist ersichtlich, daß die Seren von verschiedenen Cholinesterase-Restaktivitätstypen nach längerem Stehen unterschiedliches Verhalten zeigen. Seren von niedrigen Cholinesterase-Restaktivitätstypen weisen signifikant höhere Werte auf, der Mittelwert beträgt bei den frischen Seren 7,2, bei alten Seren 18,5 % Restaktivität. Bei Seren vom mittleren Typ ist die Änderung nicht signifikant, frische Seren ergeben durchschnittlich 31,0 %, alte Seren 36,0 % Restaktivität. Bei Seren vom hohen Typ sehen wir eine sehr starke Abnahme der Restaktivitäten, der Mittelwert beträgt bei frischen Seren 65,0 %, bei alten Seren 43,0 % Restaktivität. Die Standardabweichungen sind bei alten Seren für jeden Typ sehr hoch, für Seren vom niedrigen Typ 55,6 %, für Seren vom mittleren Typ 68,3 % und für Seren vom hohen Typ 52,5 % des jeweiligen Mittelwertes. Daraus ist ersichtlich, daß die Seren nach

längerem Stehen, mehr als 2 Tage, nicht mehr verwendbar sind.

Bevor Schlußfolgerungen für das Verfahren I gezogen werden, wollen wir auch bei der Versuchseinheit 3 den Zusammenhang zwischen Cholinesterase-Restaktivität und Alter der Seren prüfen.

In den Tabellen 7 bis 10 sind die Cholinesterase-Restaktivitäten bei frischen und alten Seren, sowie Mittelwerte und deren Standardabweichungen dargestellt.

Tabelle 7: Cholinesterase-Restaktivitäten - Versuchseinheit 3, frische Seren

ChERA Messung \ Typ	niedrig	mittel	hoch
1	15		60
2	21		76
3	22		68
4	11		77
5	25		69

Tabelle 8: Cholinesterase-Restaktivitäten - Versuchseinheit 3, alte Seren

ChERA Messung \ Typ	niedrig	mittel	hoch
1	20		53
2	26		54
3	11		71

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen von Cholinesterase-Restaktivitäten - Versuchseinheit 3, frische Seren

ChERA Typen	Parameter: Mittelwert $\bar{x}$	Standard- abweichung σ in % von $\bar{x}$	
niedrig	19	5,7	30,0
hoch	70	4,7	6,7

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen von Cholinesterase-Restaktivitäten - Versuchseinheit 3, alte Seren

ChERA Typen	Parameter: Mittelwert $\bar{x}$	Standard- abweichung σ in % von $\bar{x}$	
niedrig	19	7,6	40,0
hoch	59	18,1	17,1

Aus den Tabellen 7 bis 10 ist ersichtlich, daß die Cholinesterase-Restaktivitätswerte bei alten Seren große Standardabweichungen aufweisen, bei Typen von niedrigen Cholinesterase-Restaktivitäten 40,0 - bei Typen von hohen Cholinesterase-Restaktivitäten 17,1 % der jeweiligen Mittelwerte. Bei dieser Versuchseinheit ändert sich der Mittelwert der Restaktivitäten bei niedrigen Typen nicht, bei hohen Typen - entsprechend der Ergebnisse der Versuchs-

einheit 3 - sinkt er von 70,0 % auf 59,0 % Restaktivität ab.

Aufgrund der obigen Analyse können wir folgende Schlußfolgerung ziehen: Die Cholinesterase-Restaktivität ändert sich in Abhängigkeit von der Zeit nach Entnahme des Blutes. Bei Seren von hohem Cholinesterase-Typ sinken die Werte der Restaktivität, bei mittleren Typen ist die Änderung nicht signifikant und bei niedrigen Typen sind die Restaktivitäten erhöht oder gleichbleibend je nach dem, welche sonstigen Versuchsbedingungen vorliegen. Die Streuungen der Meßwerte sind bei allen Fällen so hoch, daß die Seren nach einer Aufbewahrungszeit von zwei Tagen nicht mehr brauchbar sind.

Auswirkung der Konzentrationsänderung von E 600 auf die Cholinesterase-Restaktivität

Mit Hilfe der Konzentrationsänderung von E 600 wollten wir erreichen, daß die drei Cholinesterase-Restaktivitätstypen gut differenzierbar werden. Es gelang uns aufgrund des Phänomens - was aus den Tabellen 1 und 2 ersichtlich ist - daß das Verhalten der Seren bei Konzentrationsänderung von E 600 typenabhängig ist.

In Abbildung 1 sind die durchschnittlichen Unterschiede der Restaktivitäten zwischen den drei Cholinesterase-Restaktivitätstypen bei verschiedenen E 600 Konzentrationen dargestellt:

Rest- aktivitäten in % der Normal- aktivitäten		Unterschied zw. niedr. u. mittl. Typen
		" " mittl. u. hohen Typen
		" " niedr. u. hohen Typen

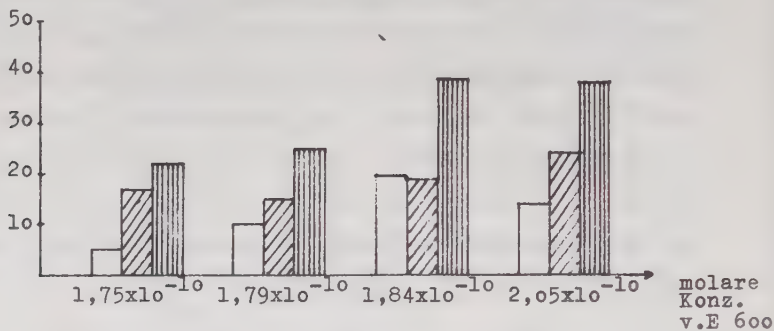


Abb. 1

Durchschnittlicher Unterschied der Restaktivitäten zwischen Typen bei verschiedenen Konzentrationen von E 600

Aus Abbildung 1 ist folgendes zu ersehen:

Bei einer Konzentration des E 600 von $1,75 \times 10^{-10}$ mol ist die durchschnittliche Differenz zwischen niedrigen und mittleren Typen 5,0 % Restaktivität; dieser geringe Unterschied ermöglicht es nicht, Seren von unbekanntem Typ in eine der beiden Gruppen einzuordnen. Bei Erhöhung der Konzentration von E 600 wird die Spannweite zwischen niedrigen und mittleren Cholinesterase-Restaktivitätstypen größer, bei $1,79 \times 10^{-10}$ mol ist es 10,0 % Restaktivität, bei

$1,84 \times 10^{-10}$ 19,5 % Restaktivität. Weitere Konzentrations-
erhöhung vermindert den Unterschied zwischen den beiden
Gruppen, bei $2,05 \times 10^{-10}$ mol ist er 14,0 %. Die Differenz
zwischen mittleren und hohen Typen ändert sich nicht ein-
heitlich mit der Konzentration des E 600. Mit zunehmender
E 600 Menge betragen die durchschnittlichen Unterschiede
der Restaktivitäten der mittleren und hohen Typen 17,0 %,
15,0 %, 19,0 % und 24,0 %. Letzter Unterschied mit $2,05 \times$
 10^{-10} mol E 600 Konzentration wäre am besten geeignet für
weitere Untersuchungen, wir nahmen dennoch die Konzentra-
tion $1,84 \times 10^{-10}$ mol von E 600 mit der Begründung, daß
die Standardabweichungen bei niedrigen und mittleren Ty-
pen in jeder Versuchseinheit größer sind als die von ho-
hen Typen, so daß die optimale Giftkonzentration bei
 $1,84 \times 10^{-10}$ mol liegt, wo die stärkste Differenzierung
zwischen niedrigen und mittleren Typen zu sehen ist.

Außer der optimalen E 600 Konzentration hinsichtlich der
Differenzierung wollten wir noch prüfen, wie die einzel-
nen Typen von Cholinesterase-Restaktivitäten auf die Än-
derung der E 600 Konzentration reagieren. Abbildung 2
zeigt den funktionellen Zusammenhang zwischen Giftkonzen-
tration und Restaktivitäten:

Rest-
aktivitäten
in % der
Normalakt.

Rest-
aktivitäten
in % der
Normalakt.

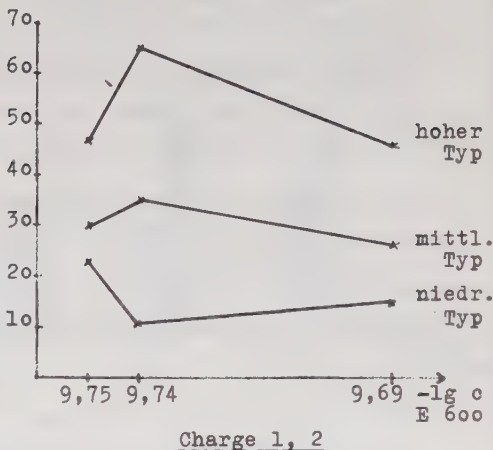
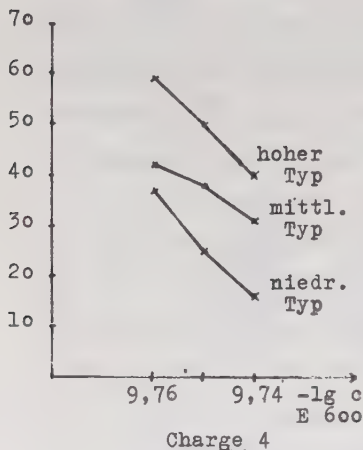


Abb. 2

Restaktivitäten im Zusammenhang
mit der E 600-Konzentration

Aus Abbildung 2 ist festzustellen, daß die verschiedenen Typen unterschiedlich reagieren auf die Konzentrationsänderung von E 600. Bei abnehmender Konzentration des Giftes tritt zuerst eine Erhöhung der Restaktivitäten bei hohen und mittleren Typen auf, dann sinken die Restaktivitätswerte, was unseren Erwartungen widerspricht. Die Änderungen der Restaktivitäten sind bei hohen Typen ausgeprägter, die Kurve verläuft steiler als bei mittleren Typen.

Niedrige Typen zeigen ein gegensätzliches Verhalten, die Abnahme der Konzentration von E 600 bewirkte als erstes ein Absinken der Restaktivitätswerte, dann steigen die Restaktivitätswerte geringfügig an.

Die Reagenzien müssen hierbei eine wesentliche Rolle spielen, die Messung mit dem Substrat von Charge 4 ergab ganz andere Kurven als die von Charge 1 und 2.

Was wir aus unserer Analyse mit Sicherheit feststellen können ist folgendes: Die Reaktion der Seren bezüglich Cholinesterase-Restaktivität bei Änderung der E 600 Konzentration ist typenabhängig.

Änderung der Cholinesterase-Restaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Inkubationszeit war am Anfang der Versuche 30 min. Die Meßwerte haben große Schwankungen bei den Typen gezeigt, die Reproduzierbarkeit war nicht ausreichend. Als Beispiel nennen wir die Werte von den Versuchseinheiten 3 und 5. Wie aus Tabelle 11 zu ersehen ist, sind wesentliche, Inkubationszeitabhängige Unterschiede bei hohen Typen zwischen 30 und 60 min festzustellen. Die weitere Erhöhung der Inkubationszeit ändert die Mittelwerte nicht signifikant. Bei niedrigen Typen weisen die Werte große

Stabilität bei den drei Inkubationszeit-Varianten auf.

Tabelle 11: Abhängigkeit der Restaktivitäten von der Inkubationszeit

Inkubations- zeit in min	Restaktivität in %		Durchschnittliche Restaktivität in % *	
	niedriger Typ	hoher Typ	niedriger Typ	hoher Typ
30	16	95	17	95
	19	-		
60	15	60	17	70
	21	76		
	22	68		
	11	77		
90	25	69	25	69

*) Falls nur einzelne Meßwerte vorlagen, sind dieselben statt Mittelwert in die Tabelle eingetragen.

Zusammenhang zwischen S-Butyryl-thiocholinjodid-Menge und Cholinesterase-Restaktivität sowie optimale Verdünnungsflüssigkeit für die E 600 Lösung:

Die zugesetzte Menge an Inkubationsansatz (Serum und E 600) zu dem Substrat und Indikator beeinflusst die Typendifferenzierung. Wir haben in unseren Versuchen verschiedene

Mengen an Inkubationsansatz genommen, jedoch erschien uns nur die 0,02 und 0,03 ml Zusatzmenge als verwertbar. Abbildung 3 zeigt die Restaktivitätsunterschiede zwischen den Typen bei 0,02 bzw. 0,03 ml Inkubationsansatz, die Abbildung beinhaltet außerdem noch die Wirkung der Verdünnungsflüssigkeit.

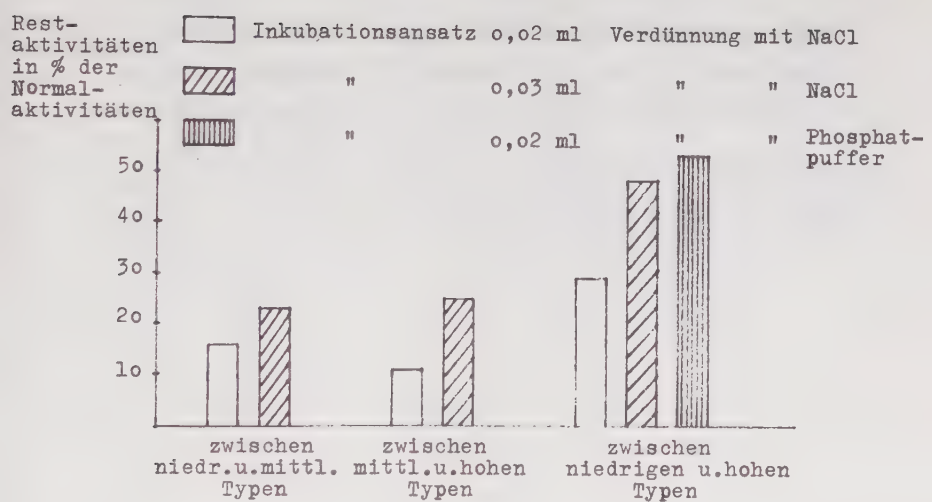


Abb. 3

Typendifferenzierung bei unterschiedlicher Menge von Inkubationsansatz und verschiedene Verdünnungsflüssigkeiten

Daraus geht hervor, daß bei Betrachtung aller drei Typen die optimale Menge 0,03 ml ist, hier ist die Differenzierbarkeit am größten.

Wenn man statt NaCl-Lösung Phosphatpuffer als Verdünnungsflüssigkeit verwendet, ist die beste Typendifferenzierung mit 0,02 ml Inkubationsansatz zu erzielen.

Dazu kommt noch der Vorteil, daß auch ältere Seren verwendet werden können, zudem sind bei Verwendung von Phosphatpuffer die Standardabweichungen bei alten Seren geringer. In den Tabellen 12 und 13 sind zwei Versuchseinheiten gegenübergestellt, bei Versuchseinheit 2 arbeiteten wir mit NaCl-Lösung, bei Versuchseinheit 3 mit Phosphatpuffer.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in den Abbildungen 4 und 5 veranschaulicht:

Tabelle 12:

Verwendung von Phosphatpuffer

Cholinesterase-Restaktivität in % der Normalaktivität
bei Versuchseinheit 3

Alter der Seren und Typen	frische Seren		S. älter als 2 Tage	
	niedriger Typ	hoher Typ	niedriger Typ	hoher Typ
Messung				
1	15	60	-	-
2	21	76	-	-
3	22	68	20	53
4	11	77	26	54
5	25	69	11	71
Mittelwert	19	70	19	59
Standardabweichung	5,7	4,7	7,6	10,1

Restaktivitätswerte bei frischen und alten Seren

Tabelle 13:

Verwendung von NaCl-Lösung

Cholinesterase-Restaktivität in % der Normalaktivität
bei Versuchseinheit 2

Messung	Alter der Seren u. Typen	frische Seren			Seren älter als 2 Tage		
		niedri- ger Typ	mittl. Typ	hoher Typ	niedri- ger Typ	mittl. Typ	hoher Typ
1		4.	30	-	20	-	46
2		7	29	73	17	42	-
3		8	28	66	6	9	19
4		10	34	52	31	57	64
5		27	36	63	-	-	-
6		-	54	71	-	-	-
Mittelwert		11,2	35,0	63,5	18,5	36,0	43,0
Standardabweichung		9,1	9,7	8,7	10,3	24,6	22,6

Restaktivitätswerte bei frischen und alten Seren

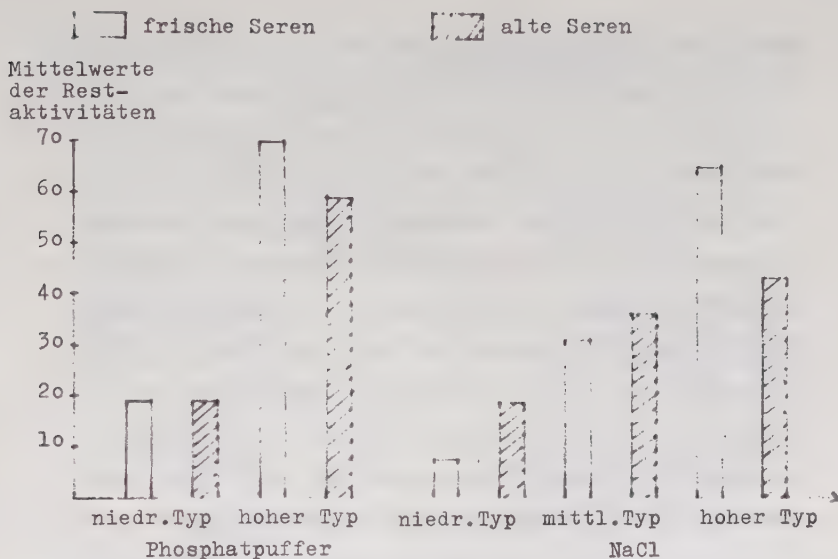


Abb. 4

Mittelwerte der Restaktivitäten
bei frischen und alten Seren

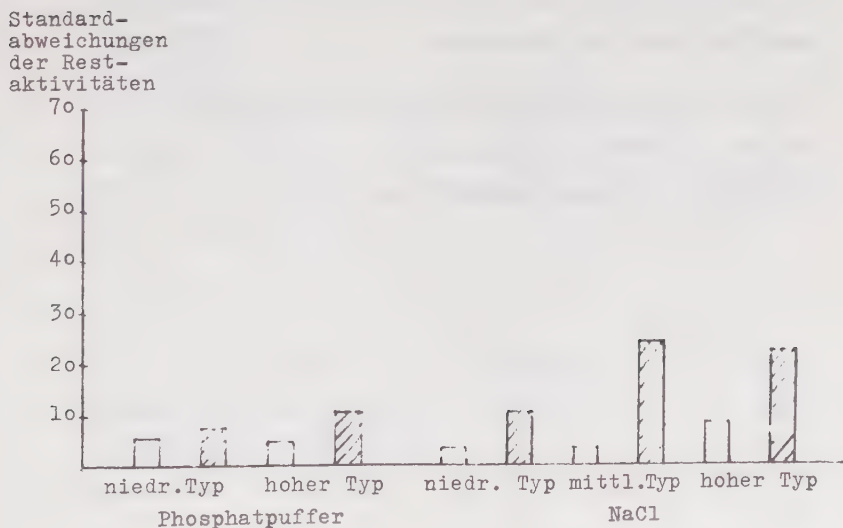


Abb. 5

Standardabweichungen der Restaktivitäten
bei frischen und alten Seren

Wie aus den Abbildungen ersichtlich ist, sind die Mittelwerte der Restaktivitäten bei Seren, die älter als zwei Tage sind, im Falle der niedrigen Typen unverändert (bei Versuchseinheit 3 19,0 %), die Abnahme der Restaktivitäten bei hohen Typen ist wesentlich geringer (bei Versuchseinheit 3 11,0 %). Im Gegensatz zu den Versuchen, wo wir NaCl-Lösung verwendet haben, sind hier die durchschnittlichen Unterschiede bei niedrigen Typen 7,3 % und bei hohen Typen 20,5 %. Die Standardabweichungen sind bei Verwendung von Phosphatpuffer wesentlich niedriger bei alten Seren als bei Verwendung von NaCl, aber auch die frischen Seren weisen geringere Streuung auf. Daraus erfolgt, daß man bei der Bestimmung der Cholinesterase-Restaktivitäten mit Phosphatpuffer eine bessere Differenzierung der Typen und eine größere Reproduzierbarkeit erzielen kann, sowie auch Seren, die älter als zwei Tage sind, verwenden kann.

Tabelle 14 zeigt die Zusammenfassung der Schlußfolgerungen und die Chargen der Reagenzien, bei deren Verwendung die Schlußfolgerungen gestützt worden sind.

Tabelle 14: Schlußfolgerungen und deren Unterstützung
bei Verwendung verschiedener Chargen der
Reagenzien

Schlußfolgerung	wird gestützt bei Anwendung von Charge			Widerspruch bei Anwendung von Charge
1. Abweichungen der Meßwerte nach längerem Stehen der Seren	2	5	4	Bei alten Seren vom niedrigen und mitt- leren Typ sind die Streuungen geringer als b. frischen Seren
2. Über optimale Giftkonzentra- tion	2	3	4	Die Typendifferen- zierung ist bei allen Giftkonzentra- tionen ähnlich
3. Über optimale Inkubationszeit			5	
4. Über optimale Menge des Inku- bationsansatzes	2	3		
5. Über optimale Verdünnungs- flüssigkeit	2		5	

Die Reaktionen verlaufen demnach nicht gleichmäßig bei allen Reagenziensätzen, sie sind offenbar empfindlich gegenüber eventuellen Verunreinigungen während der Herstellung. Es ist anzunehmen, daß die Schwankungen der Meßwerte innerhalb einer Versuchseinheit und die ungenügende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zum Teil auch darauf zurückzuführen sind.

B) Verfahren II

Photometrische Bestimmung von Cholinesterase-Restaktivitäten menschlicher Seren nach Vergiftung mit E 600, aufgrund von Farbänderung des Indikators bei enzymatischer Hydrolyse des Acetylthiocholinjodids.

Bei dieser Versuchsreihe wollten wir in erster Linie die Reproduzierbarkeit der Messungen und die optimale Giftkonzentration für Typendifferenzierung prüfen. Wir arbeiteten mit drei Seren, wobei zwei von hoher Restaktivität waren, und eines von niedriger Restaktivität. Es stand derzeit kein Serum vom mittleren Typ zur Verfügung.

1. Reagenzien

Boehringer kinetischer Cholinesterasetest, enthält:

Lösung 1: 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,2
0,00027 M Dithiobisnitrobenzoesäure
gelöst in 100 ml bidest. Wasser

Lösung 2: 0,156 M Acetylthiocholinjodid
gelöst in 3 ml bidest. Wasser

Prinzip: Die Cholinesterase katalysiert die Hydrolyse von Cholinestern. Als Substrat wird bei der vorliegenden Methode Acetylthiocholinjodid verwendet, das von der Cholinesterase des Plasmas sehr leicht gespalten wird.

Als Indikator dient 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat, das durch freigesetztes Thiocholin zum gelb gefärbten 5-Mercapto-2-nitrobenzoat reduziert wird (Knedel und Böttger (1967), Szasz (1968), Carry und Routh (1955)).

Außerdem verwendeten wir E 600 in folgenden Konzentrationen:

$$\begin{array}{l} 4,14 \times 10^{-10} \\ 3,76 \times 10^{-10} \\ 2,07 \times 10^{-10} \quad \text{molar.} \end{array}$$

Für die Verdünnung verwendeten wir 0,9 %ige NaCl-Lösung, dest. Wasser, Phosphatpuffer (bzw. Tris- und Veronalpuffer) von pH 7,0 bzw. 7,5.

2. Versuchsanordnung

Frisch entnommene Blutproben von Personen mit bekannten Cholinesterase-Restaktivitäten (nach Geldmacher-v.Mallinckrodt, Lindorf und Rabast (1969)) wurden zentrifugiert und das Serum sofort abgetrennt. Die Untersuchungen erfolgten am Tage der Entnahme sowie an zwei weiteren Tagen.

Inkubation mit E 600

Es wurden in je zwei Reagenzgläser 0,1 ml Serum und 0,9 ml Phosphat(Tris-, Veronal)-puffer von pH 7,0 bzw. 7,5 für den Normalwert bzw. 0,9 ml Giftlösung pipettiert. Die Ansätze wurden bei 37° C im Wasserbad 60 min lang inkubiert. In 3 ml Lösung 1 wurde dann 0,2 ml Inkubationsansatz und 0,1 ml Acetylthiocholinjodidlösung (0,156 M) zugesetzt.

Messung der Cholinesterase-Restaktivität:

Die Messung der Cholinesterase-Restaktivitäten erfolgte aufgrund der Farbänderung des Indikators spektrophotometrisch gegen Wasser als Leerwert. Die Extinktionszunahme wurde kontinuierlich nach 60, 120, 180 und 240 sec bei 405 nm Wellenlänge im Spektrophotometer Modell DK2 der Firma Beckman abgelesen.

Zur Beurteilung der E 600 Wirkung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen wurde die Restaktivität in % der Normalaktivität ausgedrückt.

3. Auswertung der Ergebnisse:

Bei den ersten Versuchen hatten wir eine niedrige E 600 Konzentration von $4,14 \times 10^{-14}$ M, als Verdünnungsflüssigkeit wurden 0,9 %ige NaCl-Lösung, Äthylalkohol, Tris- und Veronapuffer von pH 7,5 verwendet. Die Inkubations-

zeit war 30 bzw. 60 min., die Inkubationstemperatur betrug 25° C.

Eine große Anzahl der Meßwerte zeigte eine so geringe Reproduzierbarkeit und so geringe Typendifferenzierung, daß die statistische Auswertung nicht möglich war.

Variable Faktoren und deren Optimum:

Erst bei schrittweiser Änderung von Faktoren erreichten wir, daß gewisse - aber nicht ausreichende - Reproduzierbarkeit und Typendifferenzierung vorlagen. Die oben genannten Änderungen waren:

- Inkubationszeit ausschließlich von 60 min
- Herabsetzung des pH-Wertes von 7,5 auf 7,0
- Erhöhung der Inkubationstemperatur von 25° auf 37° C
- ausschließliche Verwendung von Phosphatpuffer
- Erhöhung der Giftkonzentration auf $2,07 \times 10^{-10}$ molar

Weitere Verbesserung der Ergebnisse gelang uns durch Konstanthalten der Temperatur während der Messung.

Auswirkung der Konzentrationsänderung von E 600 auf die Cholinesterase-Restaktivität

Um die optimale Konzentration von E 600 zu ermitteln, haben wir mehrere Messungen mit verschiedenen Vergiftungsgraden durchgeführt.

Tabellen 15 und 16 zeigen unsere Messergebnisse. In Abbildung 6 ist der Zusammenhang zwischen Giftkonzentration und Restaktivitäten dargestellt.

Daraus ist ersichtlich, daß die hohen Typen größere Stabilität d.h. bessere Reproduzierbarkeit zeigen, die Standardabweichungen bleiben bei Änderung der E 600-Konzentration klein, die Differenzierung bei den verschiedenen Konzentrationen von E 600 ist ausgeprägter als bei Seren von niedrigem Typ.

Der Unterschied zwischen den Typen ist bei $4,14 \times 10^{-10}$ molarer E 600-Konzentration am größten, trotzdem haben wir für unsere weiteren Versuche die Konzentration von $2,07 \times 10^{-10}$ molar als geeignet gefunden, hier sind die Standardabweichungen am kleinsten: 4,7 % des Mittelwertes bei hohen Typen und 4,0 % des Mittelwertes bei niedrigen Typen.

Mangel des Verfahrens und dessen Begründung

Nach diesen Versuchen kann man feststellen, daß die geeignetste E 600-Konzentration $2,07 \times 10^{-10}$ molar ist, die optimale Inkubationszeit 60 min beträgt, die Temperatur 37° C sein soll und maximal 3 Tage alte Seren verwendet werden sollen. Bei dem folgenden Verfahren haben wir dieselbe Versuchsanordnung gehabt wie bei Verfahren II, nur haben wir andere Testmaterialien genommen. Es war nämlich anzunehmen, daß unsere Extremwerte und die ungenügende Reproduzierbarkeit (hohe Standardabweichungen) der Meßwerte zum Teil dadurch entstanden sind, daß das Testmaterial von Verfahren II bei den in geringem Umfang unvermeidlich hämolytischen Seren, keine exakten Ergebnisse liefert.

Tabelle 15:

Cholinesterase-Restaktivität in % der Normalaktivität bei verschiedenen E 600- Konzentrationen

E 600 Konz. molar					
Messung		$4,14 \times 10^{-10}$	$3,76 \times 10^{-10}$	$2,07 \times 10^{-10}$	$4,14 \times 10^{-11}$
hoher Typ	1	24	37	66	81
	2	27	38	63	68
	3	27	41	67	76
	4	24	-	62	85
	5	24	-	60	96
	6	-	-	60	93
	7	-	-	-	89
	8	-	-	-	72
	9	-	-	-	72
	10	-	-	-	86
	11	-	-	-	96
	12	-	-	-	94
	13	-	-	-	97
niedriger Typ	1	14	15	30	37
	2	13	22	30	-
	3	17	23	30	-
	4	14	19	32	-
	5	19	18	30	-
	6	17	21	33	-
	7	15	-	30	-
	8	-	-	32	-

Tabelle 16: Parameter der Restaktivitäten bei verschiedenen E 600-Konzentrationen

niedriger Typ hoher Typ

E 600 Konz. molar		$4,14 \times 10^{-10}$	$3,76 \times 10^{-10}$	$2,07 \times 10^{-10}$	$4,14 \times 10^{-10}$
Parameter					
Mittelwert $\bar{X}$		25,0	38,6	63,0	85,0
Standard- abweichung	σ %	$5,2 \frac{1,3}{\% \text{ d. } \bar{X}}$	$5,4 \frac{2,1}{\% \text{ d. } \bar{X}}$	$4,7 \frac{3,0}{\% \text{ d. } \bar{X}}$	$12,1 \frac{10,3}{\% \text{ d. } \bar{X}}$
Mittelwert $\bar{X}$		15,6	19,7	31,0	(37)
Standard- abweichung	σ %	$13,0 \frac{2,2}{\% \text{ d. } \bar{X}}$	$15,0 \frac{3,0}{\% \text{ d. } \bar{X}}$	$4,0 \frac{1,3}{\% \text{ d. } \bar{X}}$	

Mittelwerte
der
Restaktivitäten in %
der Normalaktivitäten

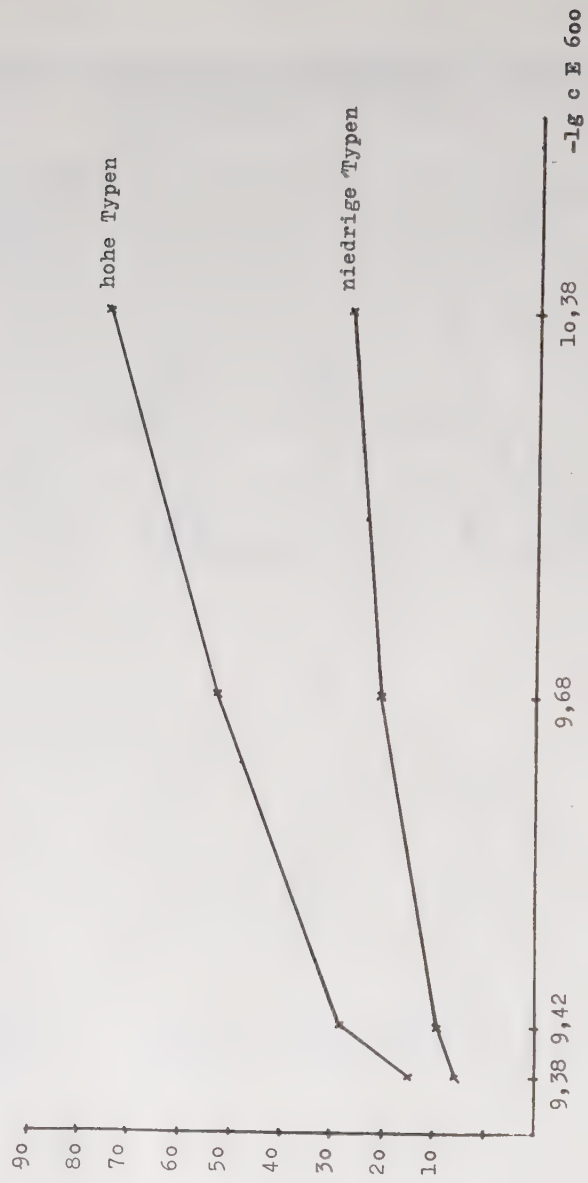


Abb. 6
Restaktivitätsänderung bei
Verschiebung der Giftkonzentration

C) Verfahren III

Photometrische Bestimmung von Cholinesterase-Restaktivitäten menschlicher Seren nach Vergiftung mit E 600 aufgrund der Farbänderung des Indikators bei enzymatischer Hydrolyse des S-Butyryl-Thiocholinjodids.

1. Reagenzien:

Merckotest^R Cholinesterase, enthält:

1. Chromogenlösung: 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,7
0,25 mM 5,5-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
2. Substratlösung: 0,12 M S-Butyrylthiocholinjodid

Prinzip: Die Cholinesterase katalysiert die Hydrolyse von Cholinestern. Als Substrat wird bei der vorliegenden Methode S-Butyryl-thiocholinjodid verwendet, das von der Cholinesterase des Plasmas sehr leicht gespalten wird. Die schon bei geringer Hämolyse freiwerdende Acetylcholinesterase der Erythrozyten verursacht hierbei keine Störung. Als Indikator dient 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat, das durch freigesetztes Thiocholin zum gelbgefärbten 5-Mercapto-2-nitrobenzoat reduziert wird. Knedel und Böttger (1961), Szasz (1968), Garry und Routh (1955).

Außerdem verwendeten wir Phosphatpuffer von pH 7,0 und E 600-Lösung wie unter II genannt.

2. Versuchsanordnung:

Frisch entnommene Blutproben von Personen mit bekannten Cholinesterase-Restaktivitäten nach Geldmacher-v.Mallinckrodt, Lindorf und Rabast (1969) wurden zentrifugiert und das Serum wurde sofort abgetrennt. Die Untersuchungen erfolgten am Tag der Entnahme sowie an weiteren vier Tagen.

Inkubation mit E 600:

Es wurden in je zwei Reagenzgläser 0,1 ml Serum und 0,9 ml Phosphatpuffer von pH 7,0 für den Normalwert sowie 0,9 ml E 600-Lösung verschiedener Konzentration pipettiert. Die Ansätze wurden bei 37° C im Wasserbad 60 min lang inkubiert.

In 2 ml Chromogenlösung wurde dann 0,1 ml Inkubationsansatz und 0,1 ml Substratlösung zugesetzt.

Messung der Cholinesterase-Restaktivität:

Die Messung der Cholinesterase-Restaktivitäten erfolgte - aufgrund der Farbänderung des Indikators - spektrophotometrisch mit dem Spektralphotometer DK 2 der Firma Beckman bei 405 nm gegen Wasser als Leerwert.

Die Extinktionszunahme wurde kontinuierlich abgelesen nach 60, 120, 180 und 240 sec.

Zur Beurteilung der E 600-Wirkung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen wurde die Restaktivität in % der Normalaktivität ausgedrückt.

3. Auswertung der Ergebnisse:

Überprüfung der optimalen Konzentration von E 600.

Angeichts der veränderten Reagenzien haben wir die optimale E 600-Konzentration noch einmal überprüft. Die Tabellen 17 und 18 enthalten die Mittelwerte der Cholinesterase-Restaktivitäten in % der Normalaktivität, sowie die Standardabweichungen in absoluter Zahl und in % der Mittelwerte bei verschiedenen E 600-Konzentrationen. Aus den Tabellen ist zu ersehen, daß die beste Typendifferenzierung bei $2,07 \times 10^{-10}$ molarer E 600-Konzentration erreicht ist, bei Seren vom niedrigen Typ ist der Mittelwert der Cholinesterase-Restaktivitäten 28,6 %, bei Seren vom mittleren Typ 41,2 % und bei Seren vom hohen Typ 55,0 % der Normalaktivität. Die Standardabweichungen sind auch bei dieser Konzentration am kleinsten, und weisen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Typen auf. Bei einer E 600 Konzentration von $3,76 \times 10^{-10}$ molar ist demgegenüber die Standardabweichung bei niedrigen Typen ungefähr das fünf-fache als bei den hohen Typen.

Tabelle 17:

Mittelwerte der Restaktivitäten bei den verschiedenen Typen bei abnehmender E 600-Konzentration

ChERA-Typen			
E 600 Konz. molar	niedrig	mittel	hoch
4,14 x 10 ⁻¹⁰	9,8	17,7	30,4
2,07 x 10 ⁻¹⁰	28,6	41,2	55,0
1,39 x 10 ⁻¹⁰	35,0	36,8	47,4
1,03 x 10 ⁻¹⁰	50,0	63,0	73,0
6,90 x 10 ⁻¹¹	58,0	70,5	78,0
5,91 x 10 ⁻¹¹	67,5	76,0	90,0
5,17 x 10 ⁻¹¹	64,0	71,5	90,0

Tabelle 18:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Restaktivitäten bei verschiedenen E 600-Konzentrationen

E 600 Konz.		3,76 x 10 ⁻¹⁰			2,07 x 10 ⁻¹⁰		
Parameter	Typ:	niedrig	mittel	hoch	niedrig	mittel	hoch
Mittelwert		15,0	-	38,6	28,6	41,2	55,0
Standard- abweichung σ		4,1	-	2,8	3,2	7,5	8,4
σ in % des Mittelwertes		27,3	-	5,4	11,3	18,1	15,2

In Abbildung 7 sind die Restaktivitäten als Funktion der E 600-Konzentration dargestellt. Um individuelle Verschiedenheiten auszusieben haben wir je Typ eine Person untersucht. Die Anzahl der Werte reicht zwar nicht aus um allgemeine Konsequenzen zu ermöglichen, aber man sieht wieder das Phänomen der beiden vorherigen Verfahren: Das Verhalten der Seren bei Konzentrationsänderung von E 600 ist typenabhängig und fallende Konzentration des Giftes erzeugt nicht unbedingt steigende Restaktivität.

Restaktivitäten
in % der Normal-
aktivitäten

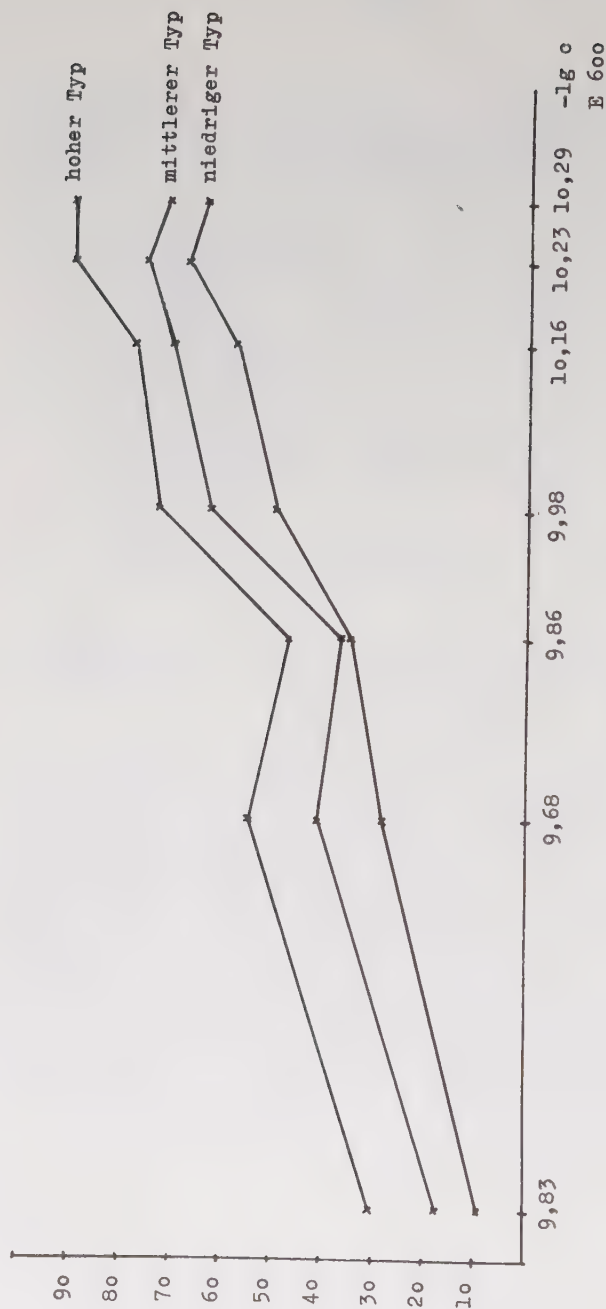


Abb. 7

Restaktivitätsänderung bei
abnehmender E 600 Konzentration

Zusammenhang zwischen Cholinesterase-Restaktivitäten und Alter der Seren

Tabellen 19 und 20 zeigen die durchschnittlichen Änderungen der Restaktivitäten nach einem bzw. nach zwei Tagen von dem Mittelwert des ersten Tages.

Wenn man die Änderung der Meßwerte in Abhängigkeit vom Alter der Seren betrachtet findet man, daß die Abweichungen vom ersten auf den zweiten, bzw. vom ersten auf den dritten Tag nach Richtung und Größe ungleichmäßig sind; es zeigt sich ein typenabhängiger Gang der Änderungen.

Es ist aus den Tabellen ersichtlich, daß die Seren vom niedrigen Typ am stabilsten sind bei längerem Stehen, sie zeigen mäßig erhöhte Restaktivitäten. Die am wenigsten stabilen, stark abnehmenden Werte, findet man bei Seren vom mittleren Typ. Seren vom hohen Typ zeigen auch Abweichungen in negativer Richtung. Die durchschnittlichen Abweichungen in % der Mittelwerte des ersten Tages verschieben das Bild, in dem Fall sind die hohen Typen am stabilsten. Bei niedrigen und mittleren Typen sieht man das gleiche Phänomen, die größeren Unterschiede bestehen nach einem Tag, am zweiten Tag nach Blutentnahme nehmen die Unterschiede ab.

Hohe Typen zeigen keine signifikante Änderung nach einem Tag, wohl aber nach zwei Tagen, hier sieht man die stärkste Abweichung unter den Typen sowohl absolut, als auch in % des Mittelwertes vom Tag der Blutentnahme.

Tabelle 19: Durchschnittliche Abweichungen der Cholinesterase-Restaktivität in 1 bzw. 2 Tagen nach Blutentnahme

ChERA Typ Zeitabstand	niedrig	mittel	hoch
	Änderung der Restaktivitäten		
nach einem Tag	+ 3,7	- 8,3	- 0,2
nach zwei Tagen	+ 1,0	- 4,0	- 6,0

Tabelle 20: Durchschnittliche Abweichungen der Cholinesterase-Restaktivität in 1 bzw. 2 Tagen nach Blutentnahme in % der Werte am Tag der Blutentnahme

ChERA Typ Zeitabstand	niedrig	mittel	hoch
	Änderung der Restaktivitäten in %		
nach einem Tag	+ 12,7	- 18,8	- 0,3
nach zwei Tagen	+ 3,4	- 9,0	- 10,6

Abhängigkeit der Cholinesterase-Restaktivität von der
Charge des Testmaterials:

Die Chargenabhängigkeit der Reaktion wurde bei diesem Verfahren auch untersucht. Tabelle 21 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen je Charge des Substrates (im Falle einzelner Messungen stehen dieselben statt Mittelwert in der Tabelle).

Die größten Standardabweichungen sind bei Charge 6 zu sehen, die größten Abweichungen vom Gesamtdurchschnitt (s. Tab. 16) bei mittleren und niedrigen Typen sind bei Charge 2 zu finden. Die besten Ergebnisse bezüglich Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung mit dem Gesamtdurchschnitt liegen bei Charge 5 vor. Demnach ist anzunehmen, daß das Testmaterial einen wesentlichen Anteil daran hat, daß unsere Methode für die Praxis keine ausreichende Genauigkeit aufweist.

Tabelle 21:

Chargenabhängigkeit der Cholinesterase-Restaktivitätswerte

Mittelwerte und Standardabweichungen von Cholinesterase-Restaktivitäten

CHERA Typ	niedrig	mittel		hoch
Charge				
Vers. Einheit	Mittelwert	Standardabw.	Mittelwert	Standardabw.
1	30,60	1,03	-	63,00
2	25,00	2,00	31,00	2,83
3	30,00	-	43,00	-
4	-	-	37,10	1,95
5	30,00	0,00	43,00	2,00
6	29,00	1,00	47,60	8,15
				10,30

IV. DISKUSSION

1. Vergleichende Analyse der drei Verfahren

a) Allgemeine Schlußfolgerungen:

In allen drei Verfahren haben folgende Feststellungen Gültigkeit:

Die optimale Temperatur beträgt während der Inkubation und während der Messung 37° C.

Das Arbeiten mit Phosphatpuffer von pH 7,0 ist optimal, es bewirkt eine größere Stabilität der Cholinesterase-Restaktivitätswerte und ermöglicht die Untersuchung älterer Seren.

b) Unterschiedliche Ergebnisse bei den drei Verfahren:

Wirkung des Alters der Seren:

(siehe dazu Tab. 7, 8, 9, 10, 19 und 20).

Das Alter der Seren hat bei den Verfahren I und III starke Auswirkung auf die Ergebnisse. (Bei Verfahren II verwendeten wir nur frische Seren). In jedem Fall zeigen die Meßwertänderungen einen typenabhängigen Gang.

Bei dem Verfahren I haben die Seren vom hohen Typ nach längerem Stehen niedrigere Cholinesterase, die Änderung bei mittleren Typen ist nicht signifikant, bei niedrigen Typen sind die Restaktivitäten erhöht oder gleichbleibend, je nach dem welche sonstigen Versuchs-

bedingungen vorliegen.

Bei Verfahren III sind die Seren vom mittleren Typ am wenigsten stabil, niedrige Typen zeigen erhöhte Werte nach längerem Stehen und hohe Typen erniedrigte Werte. Die Änderung der Cholinesterasen nach längerem Stehen sind jedoch geringer im Verfahren III als im Verfahren I.

Änderung von Inkubationszeit und Substratmenge und deren
Auswirkung auf die Cholinesterase-Restaktivität

(Siehe dazu Abb. 3, Tab. 11)

Die Änderung der Inkubationszeit von 30 auf 60 min. war beim Verfahren II die Voraussetzung um auswertbare Ergebnisse zu bekommen, beim Verfahren I zeigt sich hierbei ein leichtes Absinken der Restaktivitäten bei hohen Typen, bei niedrigen Typen bewirkt die Verlängerung der Zeit von 30 auf 60 min. keine Änderung, weitere 30 min. Inkubation erhöht mäßig die Werte von Restaktivitäten. Hierbei kann man annehmen, daß das Substrat eine Rolle spielt, bei Verfahren I und III haben wir Butyrylthiocholinjodid, beim Verfahren II Acetylthiocholinjodid verwendet.

Die Menge des Inkubationsansatzes (Serum + E 600) wirkt auch auf die verschiedenen Typen unterschiedlich, d.h. die Substratmenge welche durch die vergifteten Seren zersetzt werden soll, hat bei allen drei Verfahren ein Optimum.

Bei dem Verfahren I wirkt sich die Erhöhung der Substratmenge auf die niedrigen Typen gar nicht aus, die mittleren Typen zeigen eine mäßige - die höheren eine starke Erhöhung der Restaktivitäten.

Bei den kinetischen Tests (Verfahren II und III) haben wir stets 0,2 ml Inkubationsansatz zu dem Substrat zugesetzt, beim Verfahren I und III war das Substrat dasselbe, die Menge aber im Verhältnis von 10:1. Trotzdem waren Unterschiede von Restaktivitäten nur bei niedrigen Typen zu beobachten, im Verfahren I um 15 % im Verfahren III um 29 % bei gleicher E 600 Konzentration.

Auswirkung der Änderung der E 600 Konzentration:

Sehr wichtig erscheint uns die Auswirkung der Verschiebung von E 600 Konzentration. Hier tauchen Probleme auf, deren Lösung den Mangel unserer Methode aufzuklären vermag.

Bei Verfahren I reagieren die Seren auf Konzentrationsänderung davon abhängig, zu welchem Typ von Restaktivitäten sie gehören (s. Abb. 2, S. 32). Für alle drei Typen ist ein Konzentrationsbereich vorhanden, wo die Werte nicht nach unseren Erwartungen - nämlich höhere Giftkonzentration = niedrigere Restaktivität - liegen. Dieser Bereich liegt gleichmäßig für alle drei Typen zwischen $1,79 \times 10^{-10}$ und $2,05 \times 10^{-10}$ molar. Genau zwischen diesen beiden Werten liegt die für uns - im Bezug auf Reproduzierbarkeit und Differenzierung - optimale Konzentration: $1,84 \times 10^{-10}$ molar.

Bei Verfahren III (s. Abb. 7) ist der kritische Bereich zwischen $2,07 \times 10^{-10}$ und $1,03 \times 10^{-10}$ molare Konzentration. Die beste Differenzierung ist am Anfangspunkt dieses Bereiches, bei $2,07 \times 10^{-10}$ m.

Bei Verfahren II entspricht der Kurvenverlauf unserer Erwartung, d.h. bei Erhöhung der Giftkonzentration sinken die Restaktivitätswerte. Hier haben wir auch typenabhängige Änderungen (s. Abb. 6).

Die Rolle des Substrates bei den Verfahren I - III:

(Siehe dazu Tab. 1, 2, 17)

Bei den Verfahren I und III haben wir als Substrat Butyrylthiocholinjodid verwendet, wobei im Verfahren III wir zu der gleichen Serummenge das zehnfache der Substratmenge zugesetzt haben als im Verfahren I. Die Ergebnisse wurden dadurch nur unwesentlich beeinflusst, wir fanden leicht erhöhte Cholinesterase bei niedrigen Typen.

Innerhalb des Verfahren I hat die Änderung der Substratmenge nur bei hohen Typen eine signifikante Änderung der Cholinesterasen verursacht, (s. Versuchseinheit 10 und 11), aber diese Änderung trat auch nicht in jedem Fall auf, wo die Versuchsbedingungen nur in dieser Hinsicht differierten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben bei unseren drei Verfahren versucht die Cholinesterase-Restaktivitätswerte nach Vergiftung der menschlichen Seren mit E 600 zu ermitteln.

Die Meßergebnisse sind innerhalb eines Verfahrens und zwischen den drei Verfahren durch Widersprüche und ungenügende Reproduzierbarkeit ausgezeichnet. Man muß annehmen, daß hierbei außer der enzymatischen Hydrolyse des Substrates noch andere Faktoren mitwirken. Es liegt nahe, daß verschiedene andere Enzyme an der Reaktion beteiligt sind.

Außerdem nehmen wir an, daß die E 600 Hydrolyse selbst einen wesentlichen Anteil in der Farbänderung - die Grundlage unserer Messungen - einnimmt. Man könnte diesen Anteil "Störfaktor" nennen, was die Differenzierung zwar erheblich verbessert aber unsere Werte nicht mehr als Cholinesterase-Restaktivität ansprechen läßt. Für diese Annahme spricht noch, daß während der Arbeit beobachtet wurde, wie die E 600 Lösung nach längerem Stehen eine viel intensivere Farbänderung verursacht hat, die Extinktionszunahme aber bedeutend geringer wurde, quasi vor der Messung spielten sich Vorgänge ab, die bei sofortigem Verbrauch der E 600 Lösung während der Messungen stattfanden. Wahrscheinlich setzt sich diese Reaktion aus zwei Teilen zusammen, einmal die Selbst-

hydrolyse des E 600 im Phosphatpuffer, andererseits die Hydrolyse durch menschliche Serumenzyme. Dies "stört" die exakte Messung von Cholinesterase-Restaktivitäten, wobei bestimmte E 600 Konzentrationen für die verschiedenen Typen unterschiedliche "Störungsgrade" darstellen.

XI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALDRIDGE, W.N.
Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953 a)
2. ALDRIDGE, W.N.
Serum Esterases. 2. An enzyme hadrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953 b)
3. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)
4. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
I. Occurence of enzymes hydrolysing dimethylamido-ethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun).
Acta Chem. Scand. 8, 753 (1954 b).
5. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
II. Analysis of reaction products in experiments with Tabun and some properties of blood plasma tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 762 (1954 c)

6. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
III. Effect of cholinesterase-inhibition and
inhibition of cholinesterase in the presence of
tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 915 (1954 d)
7. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
IV. Specificity studies.
Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 e)
8. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactiva-
tion of cholinesterase by organophosphorus compounds
in vitro.
Acta Chem. Scand. 9, 310 (1955 a)
9. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic Hydrolysis of organophosphorus compounds.
VI. Effect of metallic ions on the Phosphorylphos-
phatases of human serum and swine kidney.
Acta Chem. Scand. 9, 383 (1955 b)
10. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic Hydrolysis of organophosphorus compounds.
VII. The stereospecificity of phosphorylphosphatases.
Acta Chem. Scand. 11, 1371 (1957)
11. BAUMGARTNER, W.
Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen fer-
mentativem E 600-Abbau und Vergiftung der Cholin-
esterase durch E 600 im menschlichen Serum.
Dissertation, Erlangen (1970)

12. ERDÖS, E.G. und L.E. BOGGS
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature 190, 716 (1961)
13. GARRY, P.J. und J.J. ROUTH
A Micro Method for Serum Cholinesterase.
Clin. Chem. 11, 91 (1955)
14. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M. und H.H. LINDORF
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
cholinesterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesell-
schaft für Rechtsmedizin in Berlin 6. - 9.10.1969
15. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M., U. RABAST und
H.H. LINDORF
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholin-
esterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-
phosphat).
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)
16. GROB, D., J.L. Jr. LILIENTHAL, A.M. HARVEY und
B.F. JONES
The administration of di-isopropyl fluorophosphate
(DFP) to man.
I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase;
general systemic effects; use in study of hepatic
function and erythropoiesis; and some properties
of plasma cholinesterase.
Bulletin John Hopkins Hospital 81, 217 (1947)
17. KNEDEL, M.U., R. BÖTTGER
Eine kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität
der Pseudocholinesterase (Acylcholinacylhydrolase 3.1.1.8)
Klin. Wschr. 45, 325 (1967)

18. KOELLE, G.B.
Cholinesterases and anticholinesterase agents.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie,
Ergänzungswerk XV, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg 486 - 497 (1963)

19. KRISCH, K.
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
phosphat (E 600) durch menschliches Serum.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

20. MAIN, A.R.
The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-
p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum.
Biochem. J. 74, 10 (1960)

21. MAZUR, A. und O. BODANSKY
The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of
cholinesterase activity by diisopropyl fluorophosphate.
J. Biol. Chem. 163, 261 (1946 a)

22. MAZUR, A. und O. BODANSKY
An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing
the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates.
J. Biol. Chem. 164, 271 (1946 b)

23. MOUNTER, L.A. und V.P. WHITTAKER
The Hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases
Biochem. J. 54, 551 (1953)

24. NEAL, R.A.
Studies on the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl
phosphorothionate (parathion) in vitro.
Biochem. J. 103, 183 (1967)

25. SCHAUMANN, W. und M. SCHILLER
Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im Serum.
Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 239, 114 (1960)
26. SCHRADER, G.
Chlorthion: Ein neues wenig giftiges Insektizid aus der Reihe der Thiophosphorsäureester.
Angewandte Chem. 66, 265 (1954)
27. SKRINJARIC-SPOLJAR, M. und E. REINER
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and ethyl-p-nitrophenylethylphosphate by human sera.
Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)
28. SZASZ, G.
Cholinesterase Bestimmung im Serum mit Acetyl- und
Clin. Chim. Acta 19, 191 (1968)
29. WAGNER-JAUREGG, Th.
Modellreaktionen phosphorhaltiger Enzym-Inaktivatoren.
Arzneimittel-Forschung 4, 527 (1954)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir, Herrn Professor Dr. Dr. E. Weinig für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates meinen Dank auszusprechen.

Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas, ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat.

Lebenslauf

Ich wurde am 13.1.1939 als Tochter des Arztes Dr. med. Josef Kötél und seiner Ehefrau Magdalena, geb. Gzégény, in Budapest/Ungarn geboren.

Von 1946 bis 1953 besuchte ich die Volksschule, ab 1953 bis 1957 das Humanistische Gymnasium in Pépa/Ungarn, wo ich 1957 die Reifeprüfung ablegte.

1965 übersiedelte ich mit meinem Mann Dr. jur. Josef Pétényi in die Bundesrepublik Deutschland.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich mein Medizin-Studium in Erlangen und bestand die Medizinische Staatsprüfung im Juni 1972. Im Institut für Rechtsmedizin, Erlangen, wurde mir die Möglichkeit zur Promotion gegeben.

Abstract

The first study, a descriptive study, was conducted in 1977 and 1978. The purpose of this study was to determine the prevalence of the disease in the community. The study was conducted in a community of 10,000 people. The results of the study showed that the prevalence of the disease was 1.5% in 1977 and 1.8% in 1978. The second study, a case-control study, was conducted in 1979. The purpose of this study was to determine the risk factors for the disease. The study was conducted in a community of 10,000 people. The results of the study showed that the risk factors for the disease were age, sex, and occupation. The third study, a cohort study, was conducted in 1980. The purpose of this study was to determine the natural history of the disease. The study was conducted in a community of 10,000 people. The results of the study showed that the natural history of the disease was characterized by a long incubation period and a high mortality rate.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
